



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

INMUNOEXPRESION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO EN CRIAS DE MADRES CON INGESTA CRONICA DE ALCOHOL UN MODELO EXPERIMENTAL

Vo. Bo.
Hernández

T E S I S
Que presenta:
ESTELA MARIA ARIAS RIVERA
para obtener el Título de
CIRUJANO DENTISTA



DIRIGIO Y SUPERVISO DR. JUAN CARLOS HERNANDEZ GUERRERO

México, D. F. 1994

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

1000 GRACIAS.....

A MI TAN LINDA FAMILIA Y ADOLFO

POR TODO EL INMENSO AMOR Y APOYO QUE SIEMPRE
ME HAN DADO Y A DIOS POR TENERLOS A USTEDES EN MI VIDA.

JUAN CARLOS

POR LA CONFIANZA QUE EN MI DEPOSITASTE , POR EL APOYO Y
COLABORACION QUE ME BRINDASTE Y POR LA VOZ DE ALIENTO CON QUE SIEMPRE ME
ESTIMULASTE; SENTIMIENTOS QUE EN TODO MOMENTO FUERON FUENTE DE MOTIVACION Y
ENTUSIASMO PARA REALIZAR ESTE TRABAJO.

DE IGUAL MANERA A TODAS LAS PERSONAS QUE DE ALGUN MODO MUY VALIOSO ME
COLABORARON, NUEVAMENTE 1000 GRACIAS!!!!!!

INDICE

1.0	INTRODUCCION	3
2.0	ALCOHOL BIOQUIMICA	8
2.1	ABSORCION, DISTRIBUCION Y METABOLISMO DEL ALCOHOL	8
2.2	MECANISMO DE ACCION DEL ALCOHOL	11
2.3	TOXICOLOGIA DEL ALCOHOL	11
3.0	SINDROME DEL FETO ALCOHOLICO S.F.A	13
3.1	DISFUNCION EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	15
3.2	DEFICIENCIA EN EL CRECIMIENTO	18
3.3	CARACTERISTICAS FACIALES	18
4.0	FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO	20
4.1	MECANISMO DE ACCION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO	21
5.0	INMUNOHISTOQUIMICA	22
5.1	PERSPECTIVAS HISTORICAS	22
5.2	ANTIGENO	24
5.3	ANTICUERPO	24
5.3.1	ESTRUCTURA DE UN ANTICUERPO	26
FIGURA 1		27
5.4	ANTICUERPOS POLICLONALES	28
FIGURA 2		29
5.5	ANTICUERPOS MONOCLONALES	30
FIGURA 3		33
FIGURA 4		34
6.0	HIPOTESIS	35
6.1	HIPOTESIS NULA	35
7.0	JUSTIFICACION	35
8.0	OBJETIVO GENERAL	35
8.1	OBJETIVO ESPECIFICO	35

9.0	MATERIALES Y METODOS	36
9.1	METODOS DE TINCION	39
9.1.1	METODO AVIDINA-BIOTINA	40
9.2	CORTES EN CRIOSTATO	41
10.0	RESULTADOS	42
	SECCION DE PRIMER MOLAR INFERIOR	43
	FIGURA 5	46
11.0	DISCUSION	47
12.0	BIBLIOGRAFIA	50

1.0. INTRODUCCION

La ingesta de alcohol por mujeres embarazadas ha sido reportada como causante de efectos teratogénicos desde épocas bíblicas. Originalmente el término "teratogenia" ha sido usado en alianza con anomalías físicas; literalmente significaba "formación de monstruos" (1). Teratógeno es el término adoptado para referir a sustancias causantes de menor o mayor malformaciones durante el desarrollo intrauterino. El alcohol ha sido identificado como causante del **SINDROME DEL FETO ALCOHOLICO (SFA)**, en el cual los efectos perjudiciales son pronunciados. Muchas de las investigaciones sobre los efectos del alcohol en fetos, son enfocados a las anomalías físicas caracterizadas en dicho síndrome, la atención en estos estudios ha sido puesta en los patrones de vida, inteligencia y los procesos de lectura principalmente. Los mecanismos bioquímicos responsables del conjunto de daños causados por la exposición intrauterina al alcohol no han sido bien identificados. Por otro lado la dosis responsable de la teratogenicidad del alcohol no ha sido aún determinada, esta información es vital para valorar los niveles de seguridad y patrones de la ingesta de alcohol durante el embarazo y el desarrollo, pruebas capaces basadas en lo anterior, de pronosticar e identificar los fetos con SFA.

Las perturbaciones en el crecimiento celular, también han sido asociados con el consumo de etanol (2). El consumo crónico está relacionado con la cirrosis alcohólica, la cual se caracteriza por la presencia de un despredimiento celular, seguido por necrosis e inflamación(2).

Diferentes estrategias metodológicas se han desarrollado, para estudiar los efectos inhibitorios del etanol sobre el crecimiento; por ejemplo se han empleado modelos experimentales en ratas con cirugía hepática parcial, para observar los

efectos del mismo sobre el crecimiento celular y la regeneración (3,4); además los estudios de administración crónica y aguda de etanol han indicado la inhibición normal del crecimiento celular (3,4); también los cultivos de hepatocitos han sido utilizados para probar los efectos inhibitorios del etanol sobre los procesos metabólicos regenerativos en la célula (3,4).

Así mismo, el etanol suprime los procesos involucrados en la regeneración primariamente a través de la inhibición del ADN y la síntesis de proteína (3,4,5,6,7,8). Finalmente el etanol es responsable del cambio de reducción en la célula, con alteraciones a nivel ultraestructural (3,5,6,7,8).

El factor de crecimiento epidérmico es un mitógeno el cual ha sido estudiado por estimular el crecimiento maxilofacial y la síntesis de DNA (13,14,15). Igualmente este mitógeno es de particular interés ya que el retraso del crecimiento maxilofacial, es la característica esencial del SÍNDROME DEL FETO ALCOHOLICO (S.F.A.) el cual está asociado con altos niveles de consumo de alcohol materno (16,17,18). Por otro lado el FCE ha demostrado tener un papel muy importante acelerando la erupción de dientes incisivos en ratones, provocando la proliferación de pre-odontoblastos y pre-ameloblastos (16,17,18), sin embargo, los experimentos en cultivos de tejidos indican que altas dosis de este factor pueden llegar a inhibir la morfogénesis dental temprana; también se han reportado respuestas diversas de los diferentes tejidos que componen el desarrollo dental, las cuales varían de acuerdo al estadio de desarrollo (16,17,18).

El Factor de Crecimiento Epidérmico inicialmente descrito por STANLEY COHEN en 1962 (10), como el factor de desarrollo nervioso que causó apertura prematura de los párpados y la erupción de incisivos en ratones recién nacidos, pertenece a la familia de los factores de crecimiento que incluyen al Factor de Crecimiento Transformante (16), Factor de Crecimiento contra vacuna de virus (17), y

el urogastron (18) entre otros, los cuales son capaces de unirse al receptor del FCE (18). Abbott y Pratt (19) reportaron un incremento en la proliferación de células epiteliales palatales de ratones tratados con FCE; también, causa un incremento en la proliferación del epitelio dental e inhibición del mesenquima dental en molares de embriones de ratones de 14-17 días de gestación (20).

Grupos de investigación han publicado diferentes resultados que han sido interpretados de diferentes maneras, Adamson (21), reportó la unión del FCE en embiones de ratones de 11-18 días de gestación, y al parecer su unión al epitelio durante el estadio de yema está limitado principalmente al mesenquima durante el estado de capuchón; sin embargo, Popliker y colaboradores (22) no encontraron ARNm del FCE en tejidos fetal de ratones de día 9 de gestación y concluyó que el FCE alfa o el FCE maternal estaba ligado al receptor del FCE durante el desarrollo fetal. El epitelio mandibular de embriones de ratones de 9-11 días de gestación es importante en la inducción de la odontogénesis (23); además, el patrón de la odontogénesis incluye al epitelio mesenquimatoso en el desarrollo del primer arco branquial. Debido a que el FCE causa proliferación del epitelio dental (24) e influencia la migración de células (25), la producción local de FCE se incluye en la progenesis, finalmente efectos en la síntesis y degradación de la matriz extracelular (26) al parecer están relacionadas con el desarrollo de hueso y cartilago.

La Dirección General Mexicana de Epidemiología y el Instituto Mexicano de Psiquiatría en 1988 se interesaron por estudiar los posibles efectos del consumo de alcohol en mujeres embarazadas; se conoce hoy con exactitud que el alcohol atraviesa la barrera placentaria y produce efectos teratogénicos en el feto. Estos efectos forman parte de unas anomalías congénitas importantes que se presentan en el Síndrome del Feto Alcohólico (SFA) (27). Las instituciones antes mencionadas llevaron a cabo la

primera Encuesta Nacional de Adicciones que arrojó información representativa prevalente a nivel nacional y regional sobre el uso del alcohol, tabaco y drogas psicotrópicas.

El cuestionario incluyó preguntas sobre mujeres quienes habían embarazadas por lo menos una vez en su vida, y los objetivos de este estudio fueron el de obtener información sobre el consumo de alcohol durante el embarazo, mientras están amamantando; y segundo obtener estimación de los riesgos del consumo de alcohol y resultados adversos durante el embarazo.

En el estudio realizado en 1993 por las mismas instituciones (28), se comparó patrones de relación entre el consumo del alcohol, bajo peso al nacimiento y parto prematuro; además es un estudio que cuantifica reportes propios del consumo de alcohol en los últimos 12 meses y síntomas de Síndrome de Dependencia Alcohólica (S.D.A.) por cada habitante en una familia seleccionada al azar; es decir, todas las mujeres que reportaron haber tenido hijos con bajo peso al nacimiento, de parto prematuro o con ambas situaciones, un número total de 5234 fueron involucradas en el estudio; 169 con hijos con bajo peso al nacimiento. Este es hasta el momento el documento más actualizado en cuanto a datos estadísticos sobre el consumo de alcohol en mujeres de México. Como resultado del anterior estudio se obtuvo que la prevalencia de bajo peso al nacimiento fue de 169 (3.2%) casos de los 5234 y de parto prematuro fue de 227 (4.3%), de los 5234, en las mujeres que presentaron ambas situaciones la incidencia fue de 396/5234 es decir el 7.6%, pero el hallazgo más importante en los tres casos fue que el consumo de alcohol durante el embarazo no era relativo al bajo peso de los bebés al nacimiento o al parto prematuro, sin embargo sólo en las características de alto consumo de alcohol y mujeres con Síndrome de Dependencia Alcohólica, es de alta incidencia el bajo peso al nacer o el parto

premature. Este estudio sugirió que se mantiene la dirección de los resultados hacia el Síndrome de Dependencia Alcohólica y hacia el patrón de consumo, pero oscurece la importancia de variables de las mujer

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Adicciones realizada en Junio de 1992 por la Dirección General de Epidemiología y el Instituto Mexicano de Psiquiatría se encontró que la población femenina urbana de 12 a 65 años que consumieron bebidas alcohólicas durante la lactancia a nivel nacional es del 11.0% aproximadamente 616.9 mujeres.

En vista de los aspectos inhibitorios del etanol sobre la regeneración celular y el crecimiento normal que han sido reportados; el presente estudio esta enfocado a determinar por medio de técnicas inmunohistoquímicas la inhibición del Factor de Crecimiento Epidermico en la odontogénesis en crías de madres alcohólicas.

2.0. ALCOHOL BIOQUIMICA

La unión de un grupo -OH a un átomo de carbono saturado da como resultado la familia de los compuestos denominados alcoholes, R- OH. Los alcoholes se pueden clasificar de la siguiente forma:

Alcohol primario	(RCH ₂ -OH)
Alcohol secundario	(R ₂ CH-OH)
Alcohol terciario	(R ₃ C-OH)

Por otro lado, al grupo R pueden estar unidos otros grupos funcionales pero la necesidad de que el grupo -OH esté unido a un átomo de carbono saturado es rígida (29-30).

2.1. ABSORCION DISTRIBUCION Y METABOLISMO

El alcohol se absorbe, específicamente en el intestino, en donde la porción superior del intestino delgado representa el principal sitio de ésta absorción, aquí dicho mecanismo es rápido y virtualmente completo. El determinante del grado de absorción de alcohol en el organismo es el vaciamiento del estómago, el cual está sujeto a diferentes influencias, además, el papel crucial del estómago como un impedimento temporal de la absorción se ha podido ilustrar por los hallazgos hechos en pacientes que han estado bajo gastrotomías masivas; estos pacientes usualmente se intoxican rápidamente con pequeñas cantidades de alcohol, ya que el alcohol es distribuido casi inmediatamente al sitio donde es absorbido en el intestino delgado.

El coeficiente de partición del alcohol entre el agua y grasa es de 0.10, y la distribución del alcohol a todo el cuerpo es muy similar a la de agua. El rango de entrada de alcohol a varios tejidos varía directamente con respecto al suministro de sangre a los mismos; la concentración de alcohol en el S.N.C alcanza pronto un equilibrio con respecto a la concentración de alcohol en la sangre tarda 45 minutos ó más en acercarse a los niveles de alcohol en la sangre venosa que viene a éstos tejidos, en comparación con los rangos de alcohol en la sangre sistémica. La afirmación anterior explica por que una persona con el estómago vacío puede intoxicarse tan rápidamente luego de consumir poca cantidad de bebida alcoholica (el alcohol viaja con buena perfusión al cerebro), y gradualmente el individuo en el curso de los siguientes 30 minutos estará sobrio (el alcohol es distribuído a los órganos menos irrigados). Así mismo se explica por que se encuentra esa intoxicación a menudo mas profunda durante la fase de ascenso de los niveles de alcohol en sangre que en la fase de descenso.

El alcohol que se absorbe en el cuerpo es metabolizado principalmente en hígado en mas de un 90%. El primer paso en la degradación del alcohol es la conversión a acetaldehído, un proceso que es limitado en cierta forma por el suministro del cofactor NAD. Debido a que la velocidad del metabolismo del alcohol es limitada mas por la disponibilidad del cofactor NAD que por la cantidad del sustrato, el alcohol es una de las pocas drogas cuya eliminación es una cinética de orden cero; la velocidad es constante, sin tener en cuenta la cantidad de alcohol en el sistema, únicamente los niveles de alcohol son reducidos a pequeñas cantidades. El segundo paso del metabolismo supone la conversión de acetaldehido a acetilcoenzima A o acetato, mas del cual es oxidado a CO₂, y agua produciendo 7cal/g.

El alcohol no metabolizado en hígado es excretado en gran parte sin ningún

cambio por orina y aire exalado, y pequeñas cantidades podrían ser encontradas en saliva y lágrimas; La concentración de alcohol en orina es aproximadamente 1.25 veces mayor que en sangre y la concentración en saliva es 1.12 veces mayor mientras la concentración en sangre es 2.100 mayor que en el aire alveolar. Un porcentaje máximo de alcohol puede ser metabolizado; por ejemplo, 7g (9ml) de alcohol por hora en una persona de 70Kg; esto debe ser considerado sólo como un valor promedio en el cual las variaciones individuales tan grandes como mas ó menos 50% pueden ser encontradas.

2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ALCOHOL

El mecanismo de acción depresor no ha sido definitivamente determinado. Los efectos farmacológicos son similares en muchos aspectos a los de los otros compuestos como los barbitúricos y las benzodiazepinas, debido a que se han observado funciones del S.N.C. en las que las acciones de estas drogas y el alcohol pueden traslaparse.

En particular ha sido foco de atención un complejo receptor asociado con el neurotransmisor inhibitor, llamado ácido Gama aminobutírico(GABA); cuando GABA se une a éste receptor los canales de Cl⁻ son abiertos; resultando así un decremento en la actividad de un largo grupo de neuronas del sistema nerviosos central y se conoce que el alcohol no actúa en un

2.3. TOXICOLOGIA DEL ALCOHOL

Desde el punto de vista farmacológico, el alcohol es un depresivo primario del S.N.C., y la estimulación aparente que ocurre con niveles moderados de alcohol en sangre, es el resultado de los mecanismos inhibidores que operan en el cerebro. A altas concentraciones, la acción depresora del alcohol produce una reducción progresiva de sitio receptor específico. El alcohol produce en general un aumento en la fluidez de las membranas lo que ocasiona un flujo de iones a través de las membranas neuronales y una sensibilidad alterada en esas neuronas ante la actividad eléctrica. los estados de alerta, típica embriaguez, y, finalmente un estado de anestesia farmacológica (31).

En intoxicaciones agudas, la muerte es causada por depresión irreversible de la respiración con hipoglicemia, ocasionada por la acción depresora de la neoglucogénesis. Consecuencias psiquiátricas y neurológicas de la intoxicación crónica con etanol incluyen trastornos del sueño, deterioro mental, psicosis, polineuritis y síndrome de Korsakoff.

Además, un gran número de efectos del etanol se conocen en el sistema cardiovascular (vasodilatación, cardiomiopatía), en la función hepática (hepatitis y cirrosis), en lipoproteínas del plasma (aumentando las lipoproteínas de alta densidad HDL3), triglicéridos elevados y aumento de la secreción gástrica, además en sangre (anemias megaloblasticas y sideroblasticas), aumento de la diuresis, en la función sexual (impotencia y esterilidad) y en la temperatura corporal (perdida de calor), entre otras.

3.0. SINDROME DEL FETO ALCOHOLICO

En 1968 fueron inicialmente descritas en detalle las características de niños con malformaciones fetales nacidos de madres alcohólicas, de 127 infantes expuestos a etanol en útero, 25 de ellos fueron encontrados con malformaciones faciales, anomalías de corazón, problemas de desarrollo psicomotor y lenguaje (32). En 1973 Jones y colaboradores describieron un patrón similar de anomalías en niños, designándolo como Síndrome de Feto Alcohólico (27). Tres características fueron en principio definiendo el SFA: Deficiencia en el crecimiento prenatal, fisuras parpebrales cortas y microcefalia; posteriormente se concluyó que, las tres evidencias para el diagnóstico del SFA son retardo en el crecimiento, ciertas anomalías faciales y disfunciones del Sistema Nervioso Central.

El mínimo nivel perjudicial de consumo de alcohol de la madre durante la gestación es difícil de determinar, al igual que el grado en el que el niño es afectado, pues depende no sólo de la cantidad sino también del tiempo durante la gestación cuando en que el consumo de alcohol ocurre, además, por la interacción adicional de otros factores como lo son el desplazamiento de otras fuentes de nutrientes de la dieta por el alcohol, sin embargo, existe debate entre la ingesta de etanol y la reducción o no reducción de ingesta calórica de las mujeres embarazadas que causaran retardo al desarrollo fetal; otro factor de riesgo incluye el uso de varias drogas que pueden tener efecto aditivo cuando se combinan con el alcohol; la susceptibilidad del genotipo materno y fetal a efectos teratogénicos; la edad de la madre y estado de salud de la misma. Manifestaciones de SFA no requieren constantemente de altos niveles de alcohol durante el embarazo. Se conoce que las mujeres embarazadas quienes aseguran ser tomadoras, particularmente durante el primer trimestre de embarazo son

causantes de daño al desarrollo fetal. El consumo de alcohol durante el primer trimestre de embarazo ha sido ligado con muerte fetal y aborto espontáneo, particularmente de la segunda a la octava semana el embrión es más susceptible a la teratogénesis, las malformaciones en este primer estado de desarrollo son tan severas que son incompatibles con la vida, en este estadio del embarazo también puede aparecer el aborto espontáneo. La teratogénesis en este período ocurre a nivel cromosomal. El período más crítico para el desarrollo del SNC humano son los primeros 85 días de gestación. El consumo ocasional o moderado durante este período tiene definitivamente serias repercusiones en el feto. Los alcoholes en general son altamente tóxicos, pero el etanol es menos teratogénico que el acetaldehído, los acetaldehídos en un nivel mayor de 35 mg muestran un daño muy grande en el feto, y su aumento en sangre causa defectos en las mitocondrias (33).

El SFA es aceptado en Estados Unidos como causa principal del retardo mental, la incidencia ha sido estimado entre 1 ó 2 por 1.000 nacidos vivos en este país (34), estos datos varían dependiendo de la población específica estudiada.

Aunque la circulación materna y fetal es a su vez independiente, el etanol cruza la placenta fácilmente, los niveles en sangre materna y fetal son casi iguales después de la ingesta de alcohol; el transporte ocurre por mecanismo de difusión pasiva o gradiente de concentración entre la madre y el feto y los niveles de etanol permanecen iguales hasta que todo es eliminado. El mecanismo por el cual el etanol actúa como agente teratogénico no está claramente conocido; pero consiste en múltiples aspectos dependientes del estado y la fecha; cinco mecanismos en particular son propuestos: Deterioro del transporte placentario; organogénesis anormal de músculos, hipoxia fetal, cambios en el metabolismo de prostaglandinas y metabolismo hormonal alterado.

En cuanto al primer mecanismo, el impedimento del transporte de nutrientes:

se sugiere que los aminoácidos que atraviesan la placenta son reducidos por la exposición al etanol mas no todos los nutrientes restantes. Existe otro mecanismo por el cual el transporte placentario es impedido, es referente al efecto del etanol sobre las enzimas placentarias específicamente la Na⁺-K⁺ ATPasa; se encontro que dicha enzima con la exposición al etanol, decese su actividad, lo cual disminuye el transporte de aminoácidos y azúcares, por consiguiente el crecimieto fetal se inhibe.

El segundo mecanismo es referente a que la causa de teratogénesis es durante el desarrollo anormal de filamentos musculares; los músculos expuestos durante el desarrollo se presentan en general pequeños en el SFA, esto resulta en gran parte de la anomalidad estructural en proteínas del citoesqueleto si es que el movimiento de las células es inhibido durante el desarrollo fetal.

La incidencia en el mundo de Síndrome del feto alcoholico es estimado de 1.9 de cada 1000 nacidos vivos y el consumo de alcohol durante el embarazo es considerado como la causa prevalente de retardo mental se calcula que aproximadamente 1 de cada 30 embarazadas abusan alcohol; por lo cual se establece que el 6% de los niños de estas personas nacen con anomalidades (34).

3). DISFUNCION EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El retardo mental ha sido uno de los mas serios problemas asociados con efectos teratogénicos del alcohol, la mas importante evidencia de su efecto prenatal en el cerebro son las alteraciones ultraestructurales, malformaciones causadas por daño o interrupción en la migración nueronal y glial. Las anomalías mas comunes son las displasias cerebelares (grupos de células heterotópicos), especialmente en la

superficie del cerebro; la microcefalia es una importante característica del SFA; esta entidad generalmente, ha sidio de inicio prenatal y refleja deficiente crecimiento del cerebro pero así como lo han demostrado estudios neuropatológicos y psicológicos, la normocefalia no necesariamente pronostica estructura o función normal del cerebro luego de la exposición intrauterina al alochol, por otra parte la hidrocefalia puede ser una variante ocasional en el SFA si las malformaciones que usualmente causan el crecimiento ilimitado del cerebro también interfieren con la dinámica de los fluidos cerebroespinales. Desde que el alcohol se ha presentado como agente que interfiere con la organización cerebral, el etanol es un agente etiológico en la reproducción de defectos tubo-neurales. Las anormalidades neurológicas se manifiestan luego de varias semanas o meses de nacidos, como niños irritables, y que no pueden succionar correctamente. Tiempo después se presentan alteraciones ligeras en las funciones cerebelares. e hipotonicidad; la hipertonicidad severa se observa en menor grado en pacientes mayores, y ambas se manifiestan como brazos hipotónicos y piernas hipertónicas. La hiperactividad es un componente frecuente en los niños jóvenes con el síndrome. El alcance en el cual el comportamiento es orgánico en contra de un medio ambiente determinado aún no ha sido establecido.

3.2. DEFICIENCIA DE CRECIMIENTO.

Los infantes al nacer presentan características de crecimiento deficiente en cuanto a tamaño y peso; se reporta que los pequeños pacientes presentan mas alteraciones en el peso que en tamaño, pocos logran adquirir el desarrollo luego del nacimiento. En general los niños con SFA quedan con mas de dos desviaciones por

debajo del termino medio de peso y talla, con peso mas severamente limitado. Ocasionalmente los niños afectados presentan crecimiento prenatal normal, pero llega a ser cada vez mas deficiente el desarrollo conforme pasan los meses de gestación. El decremento del tejido adiposo es casi una constante de las personas con SFA. Se ha demostrado que estos pacientes tienen niveles normales hormona del crecimiento, cortisona y gonadotropinas, las deficiencias de crecimiento en estas condiciones, reflejan entonces deficiente proliferación celular que conduce a la disminución del número de células fetales en la consecuente limitación de tamaño final en el feto.

3.3. CARACTERÍSTICAS FACIALES.

Con respecto a las características faciales que son ocasionadas por el abuso del alcohol durante el período de gestación los infantes presentan al nacer fisuras palpebrales cortas, labio superior hipoplásico, filtrum disminuído o ausente, bermellon delgado. Con frecuencia la facie es alterada con deficiencia del crecimiento mandibular e hipoplasia facial media. En cuanto a las alteraciones que mas comunmente se observan en boca estan las siguientes: labio y/o paladar fisurado, retrognatismo en un 80% en la infancia y en algunos casos los adolescentes llegan a presentar prognatismo en un 50%, los dientes son cortos, hipoplasia del esmalte, ademas de deformidades esqueléticas, principalmente en la mandibula existe una deficiencia de crecimiento y en cuanto al lenguaje se presenta transtornos con el habla.

El crecimiento de los ojos como el resto del sistema nervioso es afectado de modo adverso por la exposición al alcohol. El crecimiento limitado de los ojos es reflejado en las fisuras palpebrales cortas. La facie en general es dada por el aspecto del bermellón superior delgado, el filtrum hipoplásico y se asentúa mas por la hipoplasia facial media; la mandibula retrusiva contribuye a aplanar el perfil y ocasionalmente a bajar las fisuras palpebrales. La nariz es corta con puente bajo unido al pliegue epicantal, la nariz corta dá la impresión real o aparente de que la distancia del ala nasal al labio superior es larga. Las orejas en forma de concha pueden aparecer. La mandibula es generalmente pequeña, en algunos niños la micrognasia permanece con el aumento de la edad; en otros el crecimiento es relativamente mejor que en el tercio medio de la cara, y un aparente prognatismo puede observarse en los adolescentes.

En general la facie de los pacientes con SFA es distinta la de los pacientes con síndrome de Down y se puede apreciar claramente en los recién nacidos. Sin embargo, las anomalías importantes, tomadas individualmente, son ligeras y no son encontradas en un standar de malformaciones.

40. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO

En 1960, Stanley Cohen y cols. identificaron el factor de crecimiento epidermico como un componente activo en el extracto de una glándula submaxilar de ratones machos que causó la erupción precoz de dientes incisivos y la apertura de los párpados en ratones recién nacidos.

El factor de crecimiento epidermico es un polipéptido 53 de aminoácidos de peso molecular 6045 daltons (10), el cual es un potente mitógeno para células ectodermicas, mesodermicas y endodermicas y algunas células no epiteliales (11). En cuanto al papel fisiológico del FCE, es bien conocido que interviene en la curación de heridas, en el desarrollo y función de la glándula mamaria, y en la función reproductiva de los hombres, además de jugar un importante papel en la proliferación epitelial (35), así como en lo sugirió COHEN en 1962 (10); también en el desarrollo del pelo en ratones y otras especies, por lo que se presume que está relacionado íntimamente en la maduración epidermal y la división celular, además de esta última, el FCE afecta otras funciones celulares como la diferenciación, síntesis de varias macromoléculas y resorción de hueso. Se concluye entonces, que el FCE es una sustancia reguladora del crecimiento. Un estudio en particular determinó (14) que la erupción de los incisivos de ratones es acelerada por el FCE, y que además la proliferación de preodontoblastos y pre ameloblastos fué estimulada en la región radicular; además de que altas dosis del factor inhiben la morfogénesis dental durante la estimulación del crecimiento vascular en los tejidos circundantes.

4.1. MECANISMO DE ACCION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO

Aunque los factores de desarrollo son como agentes hormonales, no actúan por un mecanismo endócrino. Los factores de desarrollo son producidos por muchos tejidos, y las concentraciones en sangre son generalmente bajas. Los resultados indican que los factores de crecimiento ejercen su acción principalmente por mecanismos paracrinicos y autocrinicos, es decir que las células blanco en una situación de tipo paracrino son influenciadas por un factor de desarrollo producido por una célula vecina. Es obvio que el mecanismo de acción autocrino y paracrino del FCE provee posibilidades para la localización de la estimulación del crecimiento y otras funciones celulares. En adición a su papel de potente mitógeno se presentan sus efectos sobre la síntesis y degradación de las moléculas de matriz extracelular (26).

El FCE es detectado en cantidades menores en sangre, en fluidos corporales como saliva, orina (36), leche (31), fluido seminal (37), y mas notablemente en glándulas salival y duodenal, al igual que en piel y riñon. sin embargo el sitio exacto de producción del FCE no es conocido; aparentemente son una gran variedad de tejidos (38).

5.0. INMUNOHISTOQUIMICA

Con la introducción de las técnicas de rutina en el laboratorio de histología, una nueva era se presenta en el desarrollo de las tinciones de tejidos.

Estos métodos son muy sensibles y específicos, utilizan complejos antígeno-anticuerpo, que permiten la visualización de componentes celulares imperceptibles con otros métodos. La detección de inmunoperoxidasas es una importante y útil herramienta en la identificación de una gran variedad de productos celulares. La propuesta de las tinciones de inmunohistoquímica permite la visualización de tejidos antigénicos.

5.1. PERSPECTIVAS HISTORICAS

1942: Albert Coons descubrió que tintes fluorescentes como la fluorescencia podían ser conjugados con anticuerpos sin trastornarlos y con la habilidad de asociarse específicamente con tejidos del antígeno. Esto abrió la oportunidad de explotar la afinidad natural de los anticuerpos con los antígenos como un poderoso sistema de visualización en el diagnóstico inmunopatológico.

1966: El concepto de peroxidasa de anticuerpos conjugados de HORSE RADISH (rábano) estaba iniciándose por NAKANE y PIERCE.

1970: STENBERG popularizó el sistema de las peroxididas introduciendo el método de peroxididas-antiperoxididas (PAP). La evaluación simultánea de localización de antígenos y morfología de los tejidos fijados rutinariamente e incluidos en parafina incrementan la sensibilidad de la metodología, este método es altamente

popular entre los usuarios.

1980: HSU et al introdujo el complejo peroxidasa avidin-biotina los cuales demostraron gran sensibilidad y eficiencia sobre su predecesor el método PAP.

Los métodos de histoquímica prevalecen como herramienta de rutina en el diagnóstico inmunopatológico, particularmente tratando con tumores de origen desconocido.

Originalmente se realizaba por técnicas directas usando enzimas conjugadas a un anticuerpo con especificidad antigénica. Aunque a esta técnica le faltaba la sensibilidad de otros métodos, sí permitía la visualización de tejidos antigénicos usando un microscopio estandar de luz.

La sensibilidad de las técnicas de tinción de inmunohistoquímica (IHQ) estaba significativamente mejorada con el desarrollo de un método indirecto. En el segundo paso de este método varias enzimas marcadoras que se unen al anticuerpo secundario reaccionan con el antígeno unido al anticuerpo primario. Subsecuentemente la metodología peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) la cual introduce el uso de un tercer paso del método, seguida de la aplicación del anticuerpo primario, anticuerpo de conexión y un complejo peroxidasa-antiperoxidasa. Este método proporciona más sensibilidad que la tradicional técnica indirecta del segundo paso. Finalmente la Fuerte actividad de la Avidina por la Biotina en el tercer paso, desarrollada por el método del complejo Avidin-Biotina (ABC) provee incremento adicional a la sensibilidad sobre los demás métodos existentes.(39)

Es necesario en el entendimiento de la formación de bloques inmunológicos (antígeno y anticuerpo) y de los métodos de inmunoperoxidasa conocer terminos indispensable como los siguientes:.

5.2. ANTIGENO

Antígeno es una molécula generadora de una respuesta de anticuerpos. La parte del antígeno que reacciona con un anticuerpo es el determinante antigénico específico o epítipo; un antígeno tiene múltiples y diferentes epítopes potenciales, sin embargo un anticuerpo sólo se une a un epítipo específico.

Los antígenos tienen dos propiedades, la primera es inmunogenicidad, es decir la habilidad de inducir la formación de anticuerpos. La segunda es la capacidad de reactividad específica, la cual indica que el antígeno puede reaccionar con el anticuerpo que causó su producción. La reacción entre un antígeno y un anticuerpo es una de las más específicas en biología, y esta es la razón por la que las reacciones IHQ son más precisas que las técnicas histoquímicas ordinarias.

Un antígeno es una sustancia extraña al huésped, la cual estimula la formación de un anticuerpo específico, mismo que a su vez puede reaccionar con el anticuerpo producido.(39-40).

La antigenicidad es la presencia de un anticuerpo en unión activa. La preservación antigenica "óptima" implica la retención de antigenicidad que se realiza con anticuerpos disponibles.

5.3. ANTICUERPO

Un anticuerpo o inmunoglobulina es una glicoproteína del suero formada de la exposición a un antígeno, y que se une específicamente y con alta afinidad a un antígeno en forma inmune en el cuerpo o en el laboratorio. La producción de

anticuerpos es respuesta del cuerpo a un material extraño (antígeno), y es designada para librar al cuerpo de estos invasores.

Los anticuerpos estan contenidos en la fracción gama globulina del suero. Son clasificados de acuerdo a su movilidad electroforética, la cual depende primariamente de la composición de la cadena pesada y del grado de multimerización. Dependiendo de sus propiedades se diferencian las inmunoglobulinas; tales propiedades son: El peso molecular, porcentaje de carbohidratos, y propiedades funcionales en la unión de otras sustancias. De acuerdo con lo anterior se dividen en 5 clases: IgA (inmunoglobulina A), IgD, IgE, IgG e IgM; cada clase tiene sus diferentes subclases, las cuales difieren en la intercadena de unión disulfide y en las propiedades funcionales. Las propiedades funcionales de gran relevancia en inmunohistoquímica son la habilidad de complementar unión y la afinidad a la proteína A. Las soluciones de anticuerpos utilizadas en tinciones inmunohistoquímicas contienen en su mayor parte anticuerpos tipo IgG, en menor grado cantidades de otras clases.(41).

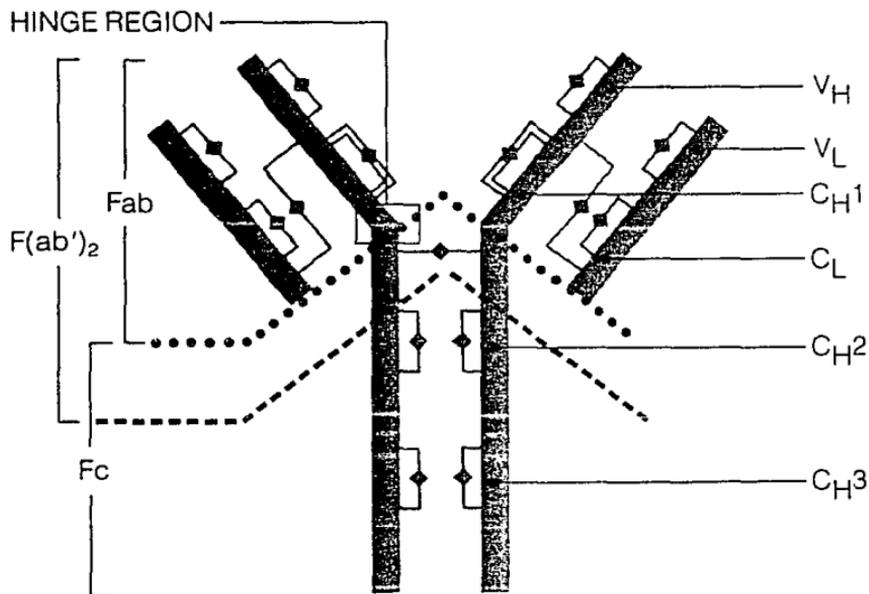
La afinidad es la fuerza de unión de un anticuerpo a un antígeno específico y es constante. En IHQ, mientras mas alta sea la afinidad constante, mejor será el anticuerpo, por que el anticuerpo tiende a permanecer unido a la búsqueda del antígeno durante el procedimiento. En contraste, el anticuerpo óptimo para la competencia de inmunoensayos, tales como radioinmunoensayo o ELISA, tienen una afinidad constante que permite la competencia exitosa para un específico niveles de antígenos. Sin embargo, los anticuerpos empleados en los ensayos han sido exitosamente usados en la IHQ.

5.3.1. ESTRUCTURA DE UN ANTICUERPO

Estructuralmente un anticuerpo está hecho de cadenas protéicas idénticas, dos cadenas pesadas y dos ligeras. En medio y dentro de las cadenas hay enlaces covalentes disulfides que unen las cadenas ligeras a las pesadas y las pesadas entre sí, muchos enlaces disulfides participan en la estructura terciaria y confieren estabilidad a la molécula de inmonoglobulina. También, está formado de fragmentos los cuales estaran unidos al antígeno: El fragmento FAB es la porción del anticuerpo que se une con el antígeno, son dos porciones FAB idénticas en cada molécula de anticuerpo. El fragmento Fc, es la porción del anticuerpo que posee determinante antigénico, fluorescencias pueden ser unidas a la porción Fc sin interferir con las porciones Fab de los sitios de unión. Esta porción Fc puede ser separada de la porción FAB por tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab'), es la última porción de un anticuerpo en el cual estan contenidos dos fragmentos FAB los cuales unen al antígeno, mas no al fragmento Fc, el cual puede unirse de modo no específico para causar fondo. Esta fracción es igualmente obtenida por tratamiento del anticuerpo con pepsina.

FIG. 1 DIAGRAMA QUE REPRESENTA LA ESTRUCTURA DE UN ANTICUERPO:

La cadena pesada (H) y la ligera (L) son compuestas de variables (V) y una constante (C) que están unidas por enlaces disulfídicos. Fragmentos (Fab) uniendo al antígeno un fragmento cristalino (Fc) y un fragmento $F(ab')_2$

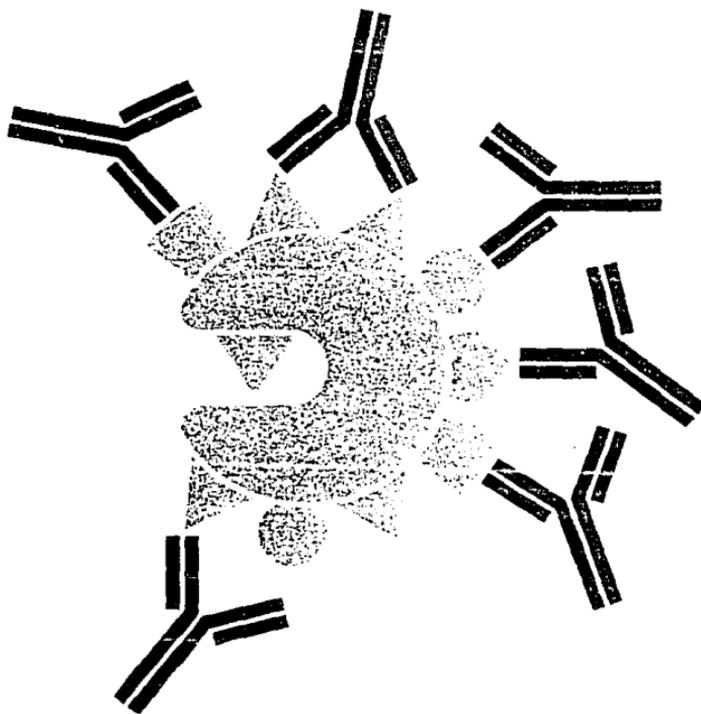


5.4. ANTICUERPOS POLICLONALES

La exitosa inmunización de animales produce una variedad de anticuerpos con diferentes especificidades y afinidades de unión denominados anticuerpos policlonaes. La molécula específica de anticuerpo de diferentes subclases puede unirse todas a la molécula deseada. El antisuero policlonaal es tan rápido y simple de obtener como el anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos policlonaes son producidos por diferentes células y en consecuencia, son inmunquímicamente desiguales; ellos reaccionan con varios epítopes sobre el antígeno contra el cual son creados. El animal más comunmente usado para la producción de anticuerpos policlonaes es el conejo, seguido por la cabra, puerco, oveja, caballo, y el cuyo entre otros, la popularidad de los conejos para la producción de anticuerpos es atribuida principalmente al fácil mantenimiento del animal; además de que los anticuerpos de conejo precipitan proteínas humanas sobre un amplio rango de antígenos (40). Una desventaja significativa, es la naturaleza heterogénea del anticuerpo policlonaal, ya que el antisuero comprende una mezcla de anticuerpos para varios epítopes del mismo antígeno y para algunas otras moléculas de inmonoglobulinas que ya estaban presentes en el animal; esta es la razón por la que en ocasiones, varios anticuerpos tienen diferentes afinidades y especificidades, convenientes en las técnicas inmunohistoquímicas. Una nueva desventaja del anticuerpo policlonaal es el suministro límite del suero de un animal.

FIG. 2 DIAGRAMA ESQUEMATICO DE UN ANTICUERPO POLICLONAL CON UNIONES DE VARIOS EPITOPES A UN ANTIGENO.



5.5. ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales son secretados por inmonoglobulinas de progenie clonal de un plasma celular híbrido. Teniendo identidad molecular, antigenicidad específica idéntica y afinidad de unión. Los anticuerpos de un clon son inmunoquímicamente iguales y reaccionan con un epítoto específico en el antígeno contra el cual fueron hechos. El ratón es el animal comunmente utilizado para la elaboración de anticuerpos monoclonales. Una gran ventaja significativa para el diagnóstico inmunohistoquímico es el desarrollo de un método que genera clones inmortales para secretar anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales tienen las siguientes ventajas sobre los policlonales:

- a. Monoespecificidad (a un epítoto simple).
- b. Inmortalidad. Debido a que ellos son progenie de células mieloma, pueden proliferar indefinidamente; los anticuerpos policlonales de suero de animales son limitados a la cantidad de suero disponible.
- c. Ya que su especificidad es generada durante selección de clones, la inmonogenicidad no necesita ser pura.

Una desventaja potencial de los anticuerpos monoclonales es que tienen más baja sensibilidad de que los anticuerpos policlonales. Solamente los anticuerpos monoclonales simples se uniran a una molécula conteniendo solo una copia del epítoto, sin embargo, la generación de estos anticuerpos es mas consumidora de tiempo y compleja, que las de antisuero policlonal. Finalmente, la inmortalidad de la síntesis de anticuerpos monoclonales no es variable. Los cuerpos monoclonales pueden espontáneamente perder dominio, en un rango de 1 a 100 o de 1 a 1000

(Kohler 1986). Una opción es el uso de mezclas de anticuerpos monoclonales, que consisten en la formación de complejos antígeno-anticuerpo con concentraciones bajas de anticuerpos, dichas mezclas tienen mayor afinidad que cada anticuerpo independiente (Moyle,1983); además, las mezclas de anticuerpos monoclonales a diferentes epítopes pueden ser mas sensibles. Los monoclonales que usamos parecen tener una sensibilidad comparable a los policlonales correspondientes.

Las células que llenan las siguientes condiciones son requeridas para la generación de anticuerpos monoclonales :

a. Inmortalidad: Debe usarse la línea de célula mieloma que se propagará indefinidamente .

b. El rango no secretorio: La línea de células mielomas no debe secretar las inmonoglobulinas que sintetiza, por que la especificidad de estas inmonoglobulinas parece irrelevante a la del epítoto buscado.

c. Células B de un animal a la línea de células mieloma: Estas células B pueden ser inducidas al secretar y sintetizar anticuerpos en respuesta a la inmunización y ellos consecutivamente sintetizan HGPRT (HIPOXANTINA GUANINA FOSFORIBOSIL TRANSFERASA) cuando las células mielomas crecen en un medio ambiente que necesita la presencia de ésta enzima para sobrevivir, y no esta presente las células mueren.

Los procedimientos para la generación de monoclonales incluyen lo siguiente:

a. Inmunización de un animal , ratón o rata, con un antígeno.

b. Cultivo de células B inmunocompetentes, cuando ha ocurrido la producción específica de anticuerpos, y la fusión de estas células con células mielomas, la fusión o hibridación de células somáticas, es inducida por un co-cultivo de células en un medio ambiente que causa fusión de membranas.

c. Todas la células han crecido en un medio ambiente que es seleccionado por las características de ambas células mielomas (inmortalidad) y células B inmunocompetentes (HGPRT suficiente).

d. Los clones de esta fusion exitosa son ensayo de la secreción de anticuepros de especificidad selectiva . El test de ensayo debe ser capaz de mostrar eficientemente los cientos de clones resultantes, los exámenes incluyen un estado sólido de un ensayo inmunoabsorbente (ELISA) y un ensayo inmunohistoquímico. La caracterización adicional de anticuerpos específicos debe ser hecha por inmunotinción o inmunoprecipitación.

e. Los clones produciendo y secretando anticuerpos de especificidad deseada e inmunoreactividad son subclonados para asegurar monoclonalidad y entonces preparados tanto in vitro como en animales.

FIG. 3 DIAGRAMA DE UN CLON DE ANTICUERPO MONOCLONAL REACCIONANDO CON UN EPI TOPE ESPECIFICO.

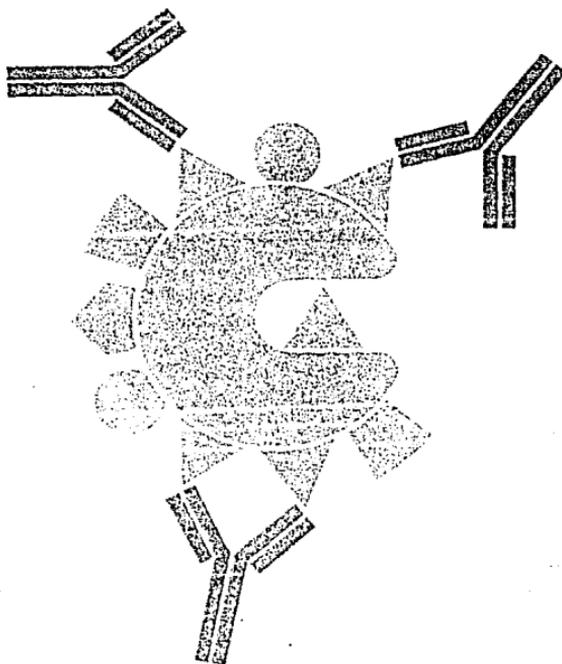
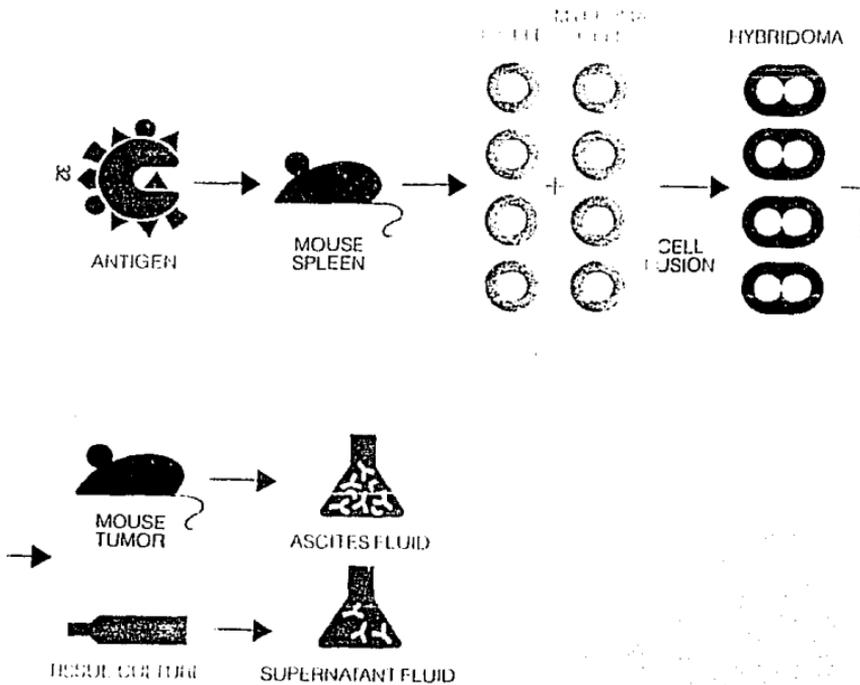


FIG. 4 DIAGRAMA DE PRODUCCION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL

El primer paso es la inyección del antígeno al ratón. Los linfocitos B son extraídos del bazo y fusionados con células mieloma. Las células híbridas (híbridoma) son propagadas por tres días a la cavidad peritoneal del ratón o al medio de cultivo.



6.0. HIPOTESIS

El consumo crónico de alcohol inhibe la actividad biológica del Factor de Crecimiento Epidérmico.

6.1. HIPOTESIS NULA

El consumo crónico de alcohol no inhibe la actividad biológica del Factor de Crecimiento Epidérmico.

7.0. JUSTIFICACION

El factor de crecimiento epidérmico es un mitógeno potente para células animales y humanas, ya que estimula la síntesis de A.D.N y la proliferación celular, sin embargo se ha avanzado poco en lo que respecta a los efectos del alcohol sobre estos mitógenos. Los factores de crecimiento posiblemente pueden ser el primer paso indispensable para muchas actividades biológicas, razón por la cual se hace necesario aclarar los múltiples eventos bioquímicos que ocurren durante y subsiguiente a la interacción del FCE con el alcohol.

8.0. OBJETIVO GENERAL

Determinar el grado de inhibición de las células mesenquimatosas en crías luego de haber sido suministrado alcohol en forma crónica a las madres.

8.1. OBJETIVO ESPECIFICO

Determinar el grado de inhibición en odontoblastos y ameloblastos después de la ingesta crónica de alcohol, por medio de técnica inmunohistoquímica.

9.0 MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron un grupo de 20 hembras vírgenes experimentales y 9 controles de cepa CD-1, de 3 a 4 semanas de edad, con peso aproximado de 20grs al inicio de la fase experimental y bajo condiciones ambientales normales del laboratorio, con temperatura controlada de 26+-1°C con un ciclo de 12 horas de luz controlable.

Al grupo experimental se le administró alcohol diluido en agua como único fluido y purina comercial ad libitum. En el orden de 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, y 18%).

Todos los animales fueron pesados cada tercer día. A la octava semana del período experimental los animales fueron distribuidos en cajas para el apareamiento; se revisó el tapón vaginal para establecer el día 0.5. Las hembras preñadas fueron pesadas en los días 7, 12, 14, 16 y 18. Al día primero de nacimiento las crías se pesaron y observadas bajo microscopio de disección para determinar alteraciones macroscópicas, fueron sacrificadas y se realizó la disección de las mandíbulas.

Se fijaron las mandíbulas en líquido para criostasis (O.C.T. COMPOUND) y fueron conservadas a -40°C en ultracongelador. Se realizaron cortes sagitales de 6 a 8 micras de grosor en microtomo para tinción de inmunohistoquímica.

Se dividieron las 20 muestras en dos grupos, Grupo A, el cual seguiría todo el procedimiento de inmunotinción en encubación a 37°C; y el Grupo B, en el que se realizaría el método de AVIDIN-BIOTINA a temperatura ambiente.

	GRUPO A	GRUPO B
PRIMER ANTICUERPO	20 minutos	45 minutos
SEGUNDO ANTICUERPO	15 minutos	30 minutos
TERCER ANTICUERPO	15 minutos	30 minutos

Se colocaron las muestras en acetona fría durante 10 minutos para ser fijadas y posteriormente se dejaron secar al aire libre.

Fueron designados previamente controles negativos en cada uno de los grupos de muestras.

Se colocaron todas las muestras en solución buffer 5 min.

En tanto, se elaboró la dilución del anticuerpo primario para la cual se utilizaron proporciones de 1:10, quedando así, 60 microlitros del anticuerpo primario y 540 microlitros del diluyente PBS.

Se secó cuidadosamente el buffer de las muestras y se le aplicó 50 microlitros de la dilución del anticuerpo primario, y las muestras designadas negativas se les aplicó el control negativo (de ratón).

Las muestras A fueron colocadas en incubadora a 37°C durante 20 min.

Las muestras B fueron dejadas a temperatura ambiente por un período de 45 min.

Muestras A se retiraron de la incubadora y se decantaron abundantemente con solución buffer, se retiró el exceso de líquido al rededor de la muestra y se les adicionó el anticuerpo de conexión o puente. Fueron sometidas a 37°C en incubadora 15 min.

Muestras B se bañaron abundantemente en solución buffer 5 min. se retiró cuidadosamente el exceso y se les adicionó el anticuerpo puente, manteniéndose a temperatura ambiente durante 30 min.

Muestras A se retiraron de la incubadora, fueron lavadas con solución buffer, para finalmente adicionarles el complejo STREPTAVIDIN ALKALINE PHOSPHATASA e incubar 15 min.

Muestras B fueron lavadas con solución buffer, y suministrado a cada muestra el complejo STREPTAVIDIN ALKALINE PHOSPHATASA, manteniéndose a

temperatura ambiente durante 15 min.

Se lavaron todas las muestras con la solución PBS y se les aplicó el cromógeno, el cual proporcionó la coloración final de la muestra.

Se realizó contratinción con la rutina de hematoxilina.

9.1 METODOS DE TINCION

Son cuatro los métodos de tinción de inmunoperoxidasas que pueden ser utilizadas para localizar antígenos celulares. La directa, la indirecta, el método PAP y el método de Avidina-Biotina. Los procedimientos de inmunoperoxidasas permiten la visualización de componentes celulares en una variedad de especímenes incluyendo secciones de parafina y secciones de criostato. La tinción con inmunoperoxidasa incluye el uso de anticuerpos y la enzima peroxidasa es comunmente usadas por varias razones:

- Es muy estable, y puede permanecer sin cambio durante el manejo, almacenamiento y aplicación.

- Es de fácil obtención en forma altamente purificada lo que permite que el riesgo de contaminación sea minimizada.

- Son partículas pequeñas lo que no interviene en la unión del anticuerpo a sitios adyacentes.

- Sólo pequeñas cantidades están presentes en tejidos del espécimen, y la actividad de la peroxidasa endógena es facilmente inhibida.

- Hay una amplia variedad de cromógenos, los cuales pueden actuar sobre las peroxidases para formar un producto coloreado que se precipitará en el sitio donde se localiza el antígeno.

9.2 METODO AVIDINA-BIOTINA

Este método es basado en la habilidad de la glicoproteína de la clara de huevo, Avidina para unirse en un enlace no inmunológico a cuatro moléculas de la vitamina Biotina. Tres reactivos son usados; el primero es el anticuerpo primario específico para el antígeno a ser localizado. El anticuerpo secundario, capaz de unirse al primero, y es conjugado a la biotina. El tercer anticuerpo es un complejo de peroxidasa conjugada con avidina y biotina. Los sitios libres de la molécula de avidina permiten el enlace a la biotina sobre el anticuerpo secundario. La enzima de peroxidasa, y el antígeno original son visualizados con un apropiado cromógeno. La técnica de avidina-biotina representa uno de los mas recientes desarrollos en las tinciones de inmunoperoxidasas; esto permite por sí solo la localización de numerosos antígenos en una amplia variedad de especímenes (39-40).

Para el presente estudio se utilizó el kit marcador de STREPTAVIDIN-BIOTINA (LSAB) DAKO corporation. Los especímenes son inicialmente encubados con un apropiado y característico primer anticuerpo de ratón o de conejo, seguidos por secuencia de incubación de 10 minutos con una conexión biotinilizada de anticuerpo y marcador de fosfatasa alcalina con streptavidina. La tinción es completada luego de 5 minutos con una solución fresca de cromógeno.

9.3 CORTES EN CRIOSTATO

Para Inmunohistoquímica , las secciones en criostato proporcionan mas preservación que los cortes en parafina; sin embargo, el detalle morfológico y la resolución es considerablemente inferior al de la parafina. Cualquier fijador puede ser usado con secciones de criostato. Esto permite a la IHQ seleccionar óptimos fijadores para cada antígeno, todo en el mismo bloque. Las secciones por congelación destinados a procesos de IHQ presentan cambios posteriores morfológicos, incluyendo cromatolisis y parente pérdida de las membranas.

10.0. RESULTADOS

En los resultados del presente estudio no existió muerte matetal atribuida a la ingesta crónica de alcohol en ninguno de nuestros animales.

Las hembras tratadas con alcohol presentaron disminución de peso corporal en cada cambio de concentración de alcohol (2%, 4%,6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16% y 18%).

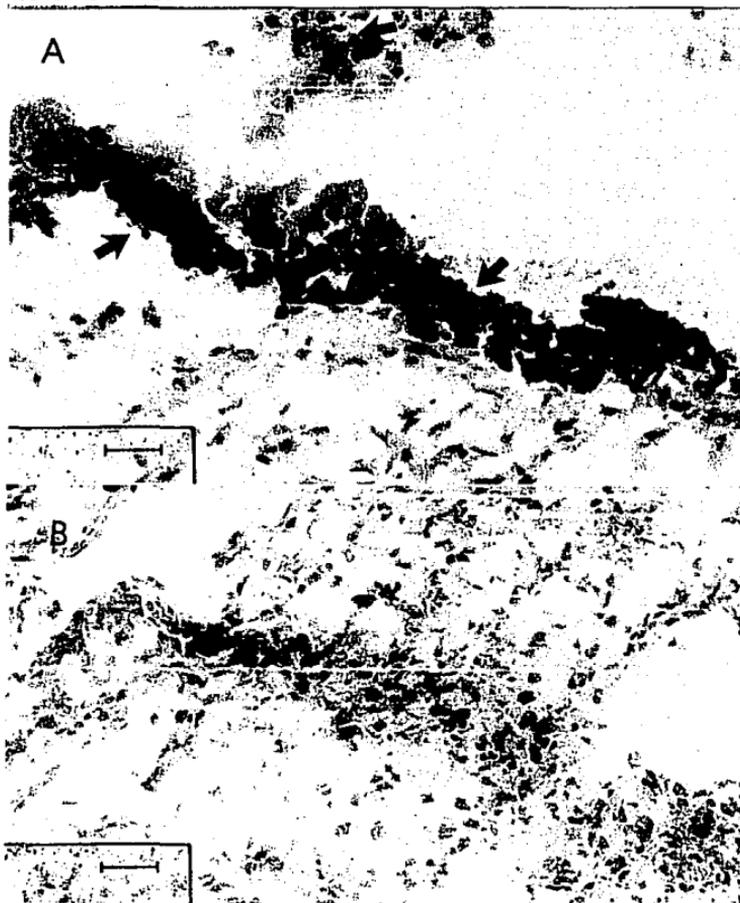
El tiempo de gestación fue prolongado en hembras alcoholizadas, el cual fué mayor comparado con el grupo control de 23 vs. 21 .

Existieron mayor número de crías en el grupo control que en el experimental, lo cual indica el alto índice de mortalidad fetal incluyendo muerte y rabsorción fetal en el grupo experimental.

Se presentaron diferencias significativas en el tamaño del cuerpo de las crías controles y las experimentales al nacimiento.

El factor de crecimiento Epidémico receptor fué expresado en la cúspide media primer molar mandibular al primer día de vida postnatal. La inmunoexpresión en todos los animales controles fué fuerte y homogénea a diferencia de una reacción leve y heterogénea en los grupos experimentales ; en ambos grupos la tinción fué menor o negativa en la parte mas coronal.

SECCION DE PRIMER MOLAR INFERIOR. A: CONTROL REACCIONANDO CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL EGF LSAB (DAKO CORPORATION); CONTRATE&IDO CON HEMATOXILINA A 37C EN ENCUBACION. La inmunotinción confirma la presencia del anticuerpo. B: EXPERIMENTAL NEGATIVO



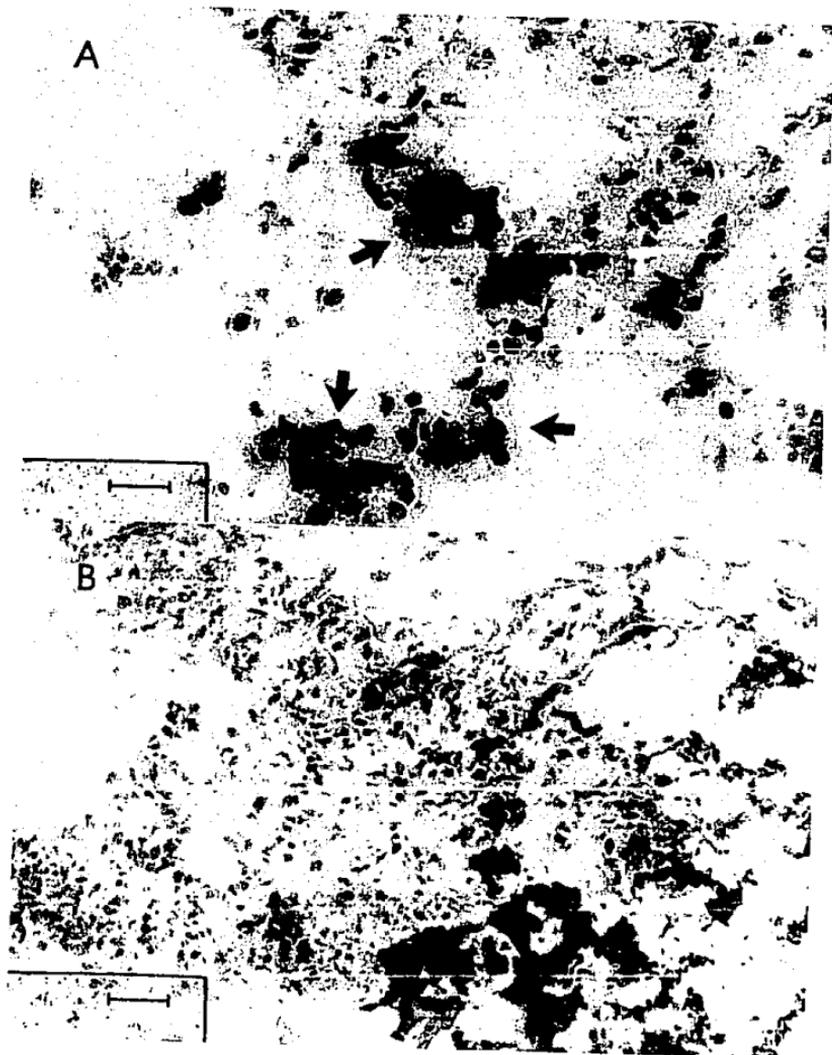
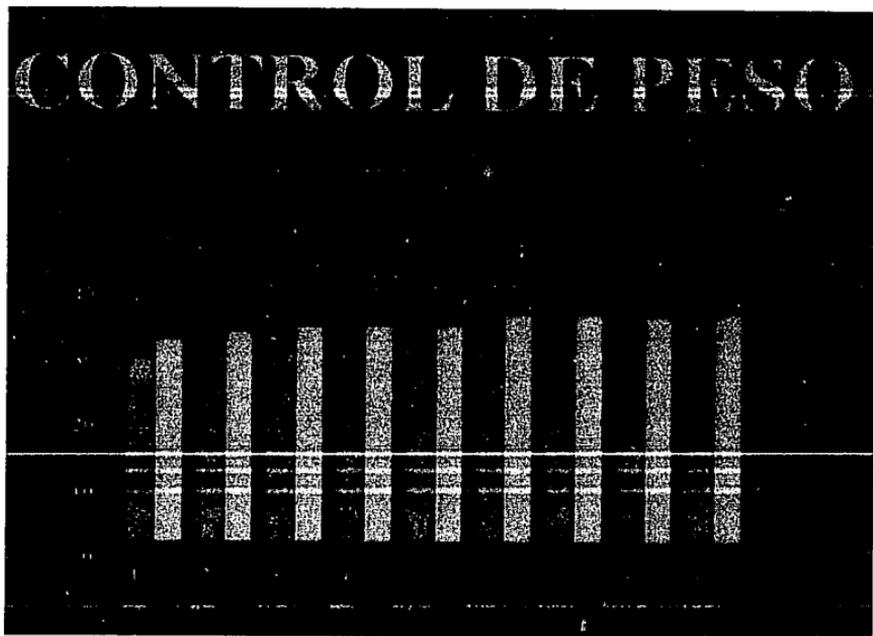




FIG.5 GRAFICA COMPARATIVA DE PESO PROMEDIO DEL GRUPO CONTROL Y EL EXPERIMENTAL.



II.O. DISCUSION

El peso al nacimiento es un índice seguro de mortalidad y morbilidad prenatal y neonatal, por ejemplo el rango de muerte neonatal para infantes con bajo peso al nacimiento (<2500 g) es 30 veces mayor que el normal. Este factor es asociado con el retardo de crecimiento postnatal, este factor es un importante elemento en el desarrollo futuro, y algunos agentes como el alcohol, el cual causa reducciones marcadas en el peso del nacido, son por lo tanto de importancia considerable (30).

La exposición intrauterina al alcohol es expresada evidentemente en una reducción en el peso de los animales recién nacidos. El peso materno y la ingesta de alimentos es reducida también por el consumo de alcohol; en algunos modelos animales se ha postulado que alteraciones nutricionales pueden ser un factor interactivo en el SFA; por otro lado las madres alcohólicas presentan decremento en el peso corporal y en el número de crías comparadas con los controles; este dato refleja los efectos directos del alcohol, aparte de los factores nutricionales; el efecto perjudicial en el peso fetal está potencializado en las crías de las madres tratadas con alcohol.

En cuanto a la composición de los animales al nacimiento la cual también está afectada, el principal efecto es un incremento en el contenido total de agua en el cuerpo y decremento en la materia lipídica.

La baja de proteínas y DNA (índices indirectos del tamaño y número celular respectivamente): La reducción en número de células es especialmente importante debido a que la hipoplasia celular es irreversible y no hay duda que interfiere en el retardo del crecimiento postnatal, característico del SFA.

En muchos casos, a los animales pueden suministrarse muy altas dosis de alcohol para obtener los mismos efectos que podrían ocurrir en los humanos; los

animales pueden metabolizar drogas más rápidamente que los humanos, por ejemplo los ratones pueden metabolizar de 300 a 500 mg/Kg/hr mientras que los humanos sólo 100mg/Kg/hr (42)

Cantidades moderadas de alcohol ingeridas durante el embarazo no parecen afectar los fetos humanos, pero niveles altos de ingesta de alcohol, especialmente en estados tempranos de embarazo causan efectos prenatales como la muerte fetal (aborto o reabsorción).

La prolongación del período gestacional en animales alcoholizados también ha sido reportado (43,44,45); un alto rango de reabsorción embrionica obtenido en este estudio sugiere que la ingesta moderada de alcohol durante el período de prefertilización y embarazo pueden tener efectos adversos en la gestación de ratones como generalmente se ha encontrado en otros experimentos con animales y en humanos.

El alcohol atravesando la barrera placentaria tiene los ya mencionados efectos teratogénicos en el crecimiento de órganos y efectos enzimáticos en el metabolismo de electrolitos; sin embargo los subsiguientes efectos en cuanto al balance del calcio en las crías no ha sido reportado, excepto por algunos casos de hipocalcemia transitoria en niños con SFA. El alcohol puede retardar el desarrollo fetal aún en ausencia de malformaciones físicas. Los efectos ligeros con sus características hipoplásticas pueden permanecer en el estado adulto. Observaciones de tejidos dentales han mostrado alteraciones en el tamaño de dientes y escasa formación de esmalte en humanos con SFA (46).

El presente estudio demostró que el FCE se encuentra inhibido casi en su totalidad en productos de hembras alcoholizadas gradualmente hasta alcanzar estados de alcoholismo crónico durante su etapa de apareamiento y gestación. Interviene de

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

esta manera el alcoholismo afectando las células de origen mesenquimatoso; transformando en consecuencia, la morfogénesis que se encuentra retrasada en nuestras muestras experimentales. La inhibición de la proliferación celular en el mesénquima dental causó aparentemente la inhibición de la morfogénesis.

BIBLIOGRAFIA

1. Lemoine P, Harrousseau J, Borteyra J, Menuet J. *Quest Med.* 1968;21:476-82.
2. Rubin E, Lieber C. Fatty liver, alcoholic hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates. *N. Engl J Med.* 1974; 290:128.
3. Wands JR, Carter EA, Bucher N, Isselbacher K. Inhibition of hepatic regeneration in rats by acute and chronic ethanol intoxication. 1979;77:528-37.
4. Frank W, Rayyes A, Washington A. Effect of acute ethanol administration upon hepatic regeneration. *J Lab Clin Med.* 1979;93:402-13.
5. Poso H, Salaspuro M, Poso A. Effects of ethanol on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Med Biol.* 1980;58:329-36.
6. Poso R, Poso H, Vaananen H, Salaspuro M. Inhibition of macromolecules by ethanol in regenerating rat liver. *Adv Exp Biol Med.* 1980;132:551-60.
7. Duguay L, Coutu D, Hetu C, Joly J. Inhibition of liver regeneration by chronic alcohol administration. *Gut.* 1928;23:8.
8. Weesner R, Mendenhall C, Morgan E, Kessler V, Krome C. Suppression of liver regeneration in ethanol-treated rats. *Gastroenterology.* 1978;75:993.

9. McNeil G, Chen T, Leevy C. reversal of ethanol and indomethacin-induced suppression of hepatic DNA synthesis by 16,16 prostaglandin E2. *Hepatology*. 1985;5:43-8.
10. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.* 1962;237:1555-62.
11. Carpenter G, Cohen S. Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 1976;88:227-38.
12. Jones K, Smith D, Ulleland C, Streissguth A. Patterns of malformation in offspring of chronic alcoholic women. *Lancet*. 1973;1:1267-71.
13. Oullete E, Rosett M, Rosman N, Weinwer L. Adverse effects on offspring of maternal alcohol abuse during pregnancy. *N England J Med*. 1977;297:528-30.
14. Thesleff I. Does epidermal growth factor control tooth eruption?. *J. of dentistry for children*. 1987; Sept-Oct:321-
15. Hoyseth K, Jones P. Minireview: Ethanol induced teratogenesis: characterization, mechanisms and diagnostic approaches. *Life Science*. 1989;44:643-9.
16. Marquardt H; Hunkapillar M.W.; Hood L.E. and Todaro G.J. (1984) Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor. *Science* 223, 1079-1081.

17. Brown J.P; Twardzik R; Marquardt H and Todaro G.J. (1985) Vaccinia virus encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor and transforming growth factor. *Nature* 313, 491-492.
18. Gregory H. (1975) Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 257, 325-327.
19. Abbot B.D. and Pratt R.M. (1987) Retinoids and epidermal growth factor alter embryonic mouse palatal epithelial and mesenchymal in organ culture. *J. craniofac. Genet. devl Biol.* 7, 219-285.
20. Partanen A-M, Ekblom P, Thesleff I. Epidermal growth factor inhibits morphogenesis and cell differentiation in cultured mouse embryonic teeth. *Develop Biol* 1985;111:84-9.
21. Adamson E. Developmental activities of the epidermal growth factor receptor. In *growth factors and development* (Ed Nielsen-Hamilton) 1990;1-29.
22. Popliker M, Shatz A, Avivi A, Ullrich A. Onset of endogenous synthesis of epidermal growth factor in neonatal mice. *Devl Biol.* 1987;119:38-44.
23. Mina M, Kollar E. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyma combinens with early murine mandibular arch epithelium. *Arch oral Biol.* 1987;32:123-7.

24. Partanen A, Thesleff I. Epidermal growth factor inhibits morphogenesis and cell differentiation in cultured mouse embryonic teeth. *Devl Biol.* 1985;111:84-89.
25. Barrandon Y, Green H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: The roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell.* 1987;50:1131-7.
26. Hamilton R, Millis A. Developmental roles for epidermal growth factor-regulated secreted proteins. In *growth factors and development*. Ed. Nilsen-Hamilton, New York. 1990:193-218.
27. Jones K, Smith D. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet.* 1977;1:1267-71.
28. Borges G, Lopez-Cervantes M, Medina-Mora ME, Tapia-Conyer R, Garrido F. alcohol consumption, low birth weight, and preterm delivery in the National Addiction Survey (México). *The International Journal of the Addictions.* 1993;28(4):355-68.
29. Wingrove A, Caret RL. Alcoholes. En *Bioquímica Orgánica*. Ed. Harla, México. 1a. d. Traducido 1984:467-94.
30. Little R, Graham J, Samson H. *Fetal alcohol effects en humans and animals*. By the Harworth press. 1982:103-22.

31. Perheentupa J, Lakshamanan J, Fisher D. Urine and kidney epidermal growth factor: ontogeny and sex difference in the mouse. *Pediat Res.* 1985;19:428-32.
32. Gorlin R, Pindborg J, Cohen M. Syndromes of the head and neck. 2nd Ed. McGraw-Hill. 1976;96-7.
33. Marck S, Hoehberg, Sheppard W. Fetal alcohol syndrome: report of case. *Journal American Dental Association.* 1988;116;198-8.
34. Waldman B.H. Fetal Alcohol Syndrome and realities of our time. *J. of Dentistry for Children.* 1989;435-7.
35. Partanen A.M. Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha in the development of epithelial-mesenchymal organs of the mouse. In *Growth Factor and Developments* Ed. Nielsen-Hamilton M. Academic Press. 1990. pp 31-53.
36. Starkey R, Ortho D. Radioimmunoassay of human epidermal growth factor (urogastrone). *J. Clin Endocrinol. Metab.* 1977;45:1144-53.
37. Pesonen K, Viinikka L, Koskimies A, Nicholson M, Perheentupa J. Size heterogeneity of epidermal growth factor in human fluids. *Life Science.* 1987;40:2489-94.
38. Rall L, Scott J, Bell G, Crawford R, Penschow J, Niall H, Coghlan. *Nature.* 1985;313:228-31.

39. Boenisch T, Farmilo A, Stead R. Antibodies, staining methods. Immunochemical staining methods. Dako corporation. 1989:1-6 13-19.
40. Bourne J. Antigens and antibodies, staining methods, staining procedures. Handbook of immunoperoxidase staining methods. 1983:7-25.
41. Clarren MD, Smith GN. The fetal alcohol syndrome. Medical progress. 1978;19:1063-7.
42. Abel E.L. Procedural considerations in evaluating prenatal effects of alcohol in animals. Neurobehavioral Toxicology. 1980;2:167-74.
43. Gianoulakis C. Effect of prenatal exposure to ethanol on body growth and the pituitary B-endorphin. Alcoholism: clin. Exp. Res. 1980;11:567-73.
44. Abel E.L. In utero alcohol exposure and developmental delay of response inhibition. Alcoholism: Clinical and Experimental research. 1982;6:369-76.
45. Hernández Guerrero JC. Morphologic effects of maternal alcohol intake on skull, mandible and tooth of the offspring in mice. Japanese Journal of Oral Biology. 1990;32:1-10.
46. Wood R. Fetal alcohol syndrome. its implications for dentistry. J AM Dent. Assoc. 1977;95:596-9.